

对二点委夜蛾高毒力苏云金芽胞杆菌的 筛选及其基因型分析*

杨云鹤^{1**} 宋 萍¹ 王振营² 董志平³ 王勤英^{1***}

(1. 河北农业大学 植物保护学院 保定 071000; 2. 中国农业科学院植物保护研究所 北京 100193;

3. 河北省农林科学院谷子研究所 石家庄 050035)

摘 要 【目的】 获得对二点委夜蛾 *Athetis lepigone* (Möschler) 高毒力的苏云金芽胞杆菌 (Bt) 菌株, 寻找对该虫具有特异杀虫活性的蛋白毒素, 探索 Bt 菌株或其杀虫基因应用于二点委夜蛾防治的可行性。

【方法】 通过生物测定方法比较了 36 株苏云金芽胞杆菌和一株恶臭假单胞工程菌 PHB-*cry1Ab* 对二点委夜蛾幼虫的杀虫活性, 同时利用 PCR-RFLP 方法对这些菌株的基因型进行了分析。【结果】 不同 Bt 菌株对二点委夜蛾幼虫的杀虫活性差别很大, 杀虫活性高的菌株都含有 *cry1Ac* 基因。饲毒 72 h 后含单基因的 Bt HD-73 菌株(*cry1Ac*)对二点委夜蛾 2 龄幼虫的毒力(LC₅₀ 值为 188.51 μg/g)明显高于含多基因的 Bt SC-40 菌株(*cry1Ac*, *cry2Ac*, *cryII*, *vip3A*)的毒力(LC₅₀ 值为 418.13 μg/g)。含有 *vip3A* 基因的 Bt SC-40 和 Bt HD-1 营养期上清液对二点委夜蛾 2 龄幼虫表现出一定的杀虫活性(72 h 死亡率分别达到 42.5%和 57.4%), 而无 *vip3A* 基因的 Bt HD-73 营养期上清液未表现出明显的杀虫活性。【结论】 由 *cry1Ac* 基因编码的 Cry1Ac 蛋白对二点委夜蛾幼虫具有特异杀虫活性, Vip3A 蛋白对二点委夜蛾幼虫可能也有一定的杀虫活性。

关键词 苏云金芽胞杆菌, 二点委夜蛾, 基因型鉴定, 杀虫活性, Vip3A 蛋白, Cry1Ac 蛋白

Selection and genotype analysis of Bt isolates with high virulence against *Athetis lepigone* (Möschler)

YANG Yun-He^{1**} SONG Ping¹ WANG Zhen-Ying² DONG Zhi-Ping³ WANG Qin-Ying^{1***}

(1. College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China;

2. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100093, China;

3. Institute of Millet Crops, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050035, China)

Abstract [Objectives] To obtain Bt strains and insecticidal proteins with high insecticidal activity against *Athetis lepigone* (Möschler). [Methods] The insecticidal activities of 36 Bt strains and an engineered *Pseudomonas putida* with a *cry1Ab* gene were evaluated on second instar larvae of *A. lepigone* by bioassay. PCR-RFLP analysis was performed to verify the genotypes of all Bt isolates. [Results] The bioassay results indicated obvious differences in the insecticidal activities of the different Bt isolates tested. The results also revealed that the Bt strains with high insecticidal activity all contained the *cry1Ac* gene. Furthermore, the results of a comparison of the toxicities of Bt SC-40 (*cry1Ac*, *cry2Ac*, *cryII*, *vip3A*) and Bt HD-73 (*cry1Ac*) showed that the LC₅₀ of BT HD-73 (188.51 μg/g) was lower than that of Bt SC-40 (418.13 μg/g). The supernatants from the vegetative stage of Bt SC-40 and Bt HD-1 with the *vip3A* gene showed certain insecticidal activities (42.5 % and 57.4 % mortality, respectively) to second instar larvae of *A. epigone*. However, the supernatants of Bt HD-73 with no *vip3A* gene did not show obvious insecticidal activity. [Conclusion] These results imply that the Cry1Ac toxin encoded by the

* 资助项目: 公益性行业(农业)科研专项(201303026)

**E-mail: fiona777745@gmail.com

***通讯作者, E-mail: wqinying@hebau.edu.cn

收稿日期: 2014-03-15, 接受日期: 2014-04-01

cryIAc gene play an important role in the resistance of plants to *A. lepigone* larvae. Vip3A may also have some insecticidal properties with regard to this pest.

Key words *Bacillus thuringiensis*, *Athetis lepigone*, genotype identification, insecticidal activity, Vip3A protein, Cry1Ac protein

二点委夜蛾 *Athetis lepigone* (Möschler) 属鳞翅目、夜蛾科, 2005 年首先在河北省发现危害夏玉米苗, 2011 年在黄淮海夏玉米区的河北、山东、河南、安徽、江苏、山西和北京 7 省(市)暴发危害, 对夏玉米的生产造成严重威胁, 成为我国夏玉米区苗期的新害虫(姜京宇等, 2008; 王振营等, 2012)。幼虫喜阴暗潮湿畏惧强光, 一般在玉米幼苗周围的碎麦秸下为害玉米苗, 主要咬食玉米茎基部, 形成 3~4 mm 圆形或椭圆形孔洞, 切断营养输送, 造成玉米心叶萎蔫枯死, 也有的咬断玉米根部, 包括气生根和主根, 导致玉米倒伏或死亡, 造成缺苗断垄, 甚至达到毁种的程度(姜京宇等, 2008; 马继芳等, 2012)。由于该害虫的这种隐蔽危害方式, 导致药液很难直接喷洒到虫体上, 而撒毒土也因麦秸和麦糠阻隔很难直接接触虫体, 防治困难(王振营等, 2012)。缺乏有效地防治技术也是导致 2011 年二点委夜蛾严重发生的原因之一(王振营等, 2012)。因此, 寻找对二点委夜蛾有效的防治措施, 特别是生态环保的生物防治技术具有重要的意义。

苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 是目前应用广泛而有效的一种微生物杀虫剂, 由于其在生物防治实践中的突出作用(黄大昉和林敏, 2001; Sanahuja *et al.*, 2011), 受到世界各国的极大关注, 筛选具有高活性和特异杀虫活性的新菌株, 一直是最活跃的研究领域(Bravo *et al.*, 1998; Hernández *et al.*, 2005)。Bt 的杀虫活性主要来源于杀虫晶体蛋白 (Insecticidal crystal proteins, ICPs) 组成的伴孢晶体, 又称为 δ -内毒素, 此外还发现某些 Bt 菌株在营养生长期产生并分泌到胞外培养基中的蛋白也具有杀虫活性, 被称为营养期杀虫蛋白, 该类蛋白具有广谱的杀虫活性(Bravo *et al.*, 2007)。虽然目前已经分离出多个对鳞翅目、双

翅目、鞘翅目及其它害虫高效的菌株 (Bravo *et al.*, 2011), 但是由于二点委夜蛾是近几年新发生的玉米重要害虫, 目前还没有针对二点委夜蛾高效菌株方面的报道。本文采用生物测定的方法, 对河北农业大学害虫生物防治实验室保存的 36 株 Bt 菌株对二点委夜蛾幼虫的杀虫活性进行了评价, 并对这些菌株的基因型进行了分析, 以期寻找对该虫具有特异杀虫活性的菌株及杀虫基因, 进一步探索 Bt 菌株或其杀虫基因应用于二点委夜蛾防治的可行性。

1 材料与方法

1.1 菌株和试虫

苏云金芽胞杆菌菌株见表 1 (共 36 株), 均由河北农业大学害虫生防实验室提供。恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* PHB-*cryIAb* 是作者实验室构建的能表达 Cry1Ab 蛋白的工程菌。

二点委夜蛾蛹由河北省农林科学研究院谷子研究所提供, 在河北农业大学植保学院养虫室用人工饲料饲养至 2 龄幼虫, 用于生物活性测定。

1.2 Bt 菌株杀虫基因型的鉴定

参考宋福平等 (1998) PCR-RFLP 方法对所有供试菌株进行基因型鉴定。基本步骤如下: 所有供试的 Bt 菌株分别接种于 LB 液体培养基, 30℃、200 r/min 振荡培养过夜, 取 1 mL 菌液于 1.5 mL 离心管中, 瞬时离心, 弃上清液, 菌体用 100 μ L 超纯水悬浮, 100℃水浴裂解 10 min, -20℃放置 5 min, 重复 1 次, 4℃、12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液为模板。利用 *cry* 基因的 K5UN2/K3UN2、K5UN3/K3UN3 和 SUN2/SUN3 等通用引物进行 PCR 扩增, 然后分别用 *Pst* I/*Xba* I, *Eco*R I/*Pst* I 和 *Msp* I/*Hind* II 内切酶对扩增产物进行双酶切分析。PCR 反应参数为: 94℃变

性 1 min, 53℃退火 1 min, 72℃延伸 3 min, 30 个循环, 最后 72℃延伸 10 min。PCR 产物双酶切的酶切体系为: PCR 扩增产物 6 μL, 缓冲液 1 μL, 内切酶各加入 0.5 μL, 最后用超纯水补齐至 10 μL, 37℃水浴酶切 2 h。PCR 扩增产物和双酶切产物用 1%琼脂糖凝胶电泳分析。

1.3 Bt 菌株毒力的测定

1.3.1 菌悬液制备 将所有供试的 Bt 菌株接种于 LB 固体平板上培养, 28℃培养至胞晶分离期 (3~4 d) 刮菌。将工程菌 *Pseudomonas putida* PHB-*cryIAb* 也接种于含 LB 固体平板上, 培养 24 h 刮菌。每个平板上加入 2 mL 灭菌水, 将菌体从平板上刮下, 放入离心管中, 4℃、6 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液留取沉淀即为胞晶混合物, 称取胞晶混合物的湿重, 加入无菌水配成湿重浓度为 500 mg·mL⁻¹ 的菌悬液待用。

1.3.2 Bt 菌株对二点委夜蛾幼虫杀虫活性的测定 用人工饲料混合饲喂法测定 Bt 胞晶混合物对二点委夜蛾 2 龄幼虫的杀虫活性。将已得到的各菌株 500 mg/mL 的菌悬液用灭菌水稀释 5 倍至 100 mg/mL 浓度的菌悬液, 10 g 饲料中加入 1 mL 稀释后的菌液, 拌匀后平均分装于 24 孔板内, 每孔接入 1 头 2 龄幼虫, 一个 24 孔板为一个重复, 每个处理重复 3 次, 以无菌水处理饲料作对照, 试虫置于 (26±1)℃、65%RH、14 L:10 D 光照条件下培养, 72 h 后统计各处理幼虫死亡头数。

1.3.3 Bt 菌株 LC₅₀ 测定 取 1.3.1 制备的 Bt SC-40 菌株和 Bt HD-73 胞晶混合物, 用灭菌水稀释成系列浓度梯度, 按照 1.3.2 的生测方法进行毒力测定, 利用 SAS 软件计算 LC₅₀。

1.3.4 Bt SC-40 菌株营养期杀虫蛋白的杀虫活性测定 参考何晓明等 (2011) 方法提取 Bt SC-40、Bt HD-1 和 Bt HD-73 菌株的营养期杀虫蛋白: 分别取 3 个菌株斜面保存的菌种接种于 10 mL 的 LB 液体培养基中, 28℃、180 r/min 振荡培养活化过夜, 然后按 1%接菌量转接到 200 mL 的 LB 液体培养基中, 28℃、180 r/min 振荡培养至营养生长期 (约 14 h) 即停止, 4℃、6 000 r/min

离心 10 min, 取上清过 0.45 μm 滤膜, 所得上清液即为营养期蛋白用于生物活性测定。

2 结果与分析

2.1 Bt 菌株的基因型及对二点委夜蛾的杀虫活性

对本实验室保存的 36 株 Bt 菌株和 1 株恶臭假单胞工程菌 PHB-*cryIAb* (含有 *cryIAb* 单基因) 进行了生物测定, 同时对各菌株的基因型进行了分析, 结果见表 1。Bt L-2、Bt L-10、Bt L-13、Bt L-17、Bt L-22、Bt SC-39 和 Bt SC-40 菌株的菌悬液对二点委夜蛾的 2 龄幼虫均表现较高的杀虫活性, 72 h 校正死亡率均为 100%。基因型分析发现, 这些菌株均同时含有 *cryIac*、*cry2Ac*、*cryII*、*vip3A* 这 4 种基因, 而同样还有多基因的 Bt HD-1 菌株 72 h 时校正死亡率只有 54.2%。含有 *cryIac* 单基因的 Bt HD-73 菌株的杀虫活性也高达 98.60%, 含有 *cryIAb* 单基因的工程菌 PHB-*cryIAb* 72 h 对二点委夜蛾 2 龄幼虫的致死率仅为 16.7%。初步推断 *cryIac* 基因编码的 CryIac 蛋白可能与 Bt 菌株对二点委夜蛾幼虫的杀虫活性有关, 而 *cryIAb* 基因编码的 CryIAb 蛋白在 100 mg/mL 浓度下的杀虫活性较低。

2.2 Bt SC-40 和 Bt HD-73 菌株对二点委夜蛾 2 龄幼虫的毒力

为了进一步明确对二点委夜蛾幼虫具有杀虫活性的 Bt 杀虫蛋白, 本研究进一步比较了含多基因的 Bt SC-40 和含单基因的 Bt HD-73 两个菌株的毒力。毒力测定结果表明, Bt SC-40 和 Bt HD-73 胞晶混合物对二点委夜蛾 2 龄幼虫的 LC₅₀ 值分别为 418.1 μg/g (饲料) 和 188.5 μg/g (饲料) (表 2)。尽管两个菌株都含有 *cryIac* 基因, 但是含有单一 *cryIac* 基因的 Bt HD-73 的毒力远远高于多基因的 Bt SC-40 毒力, 该结果进一步说明 *cryIac* 基因的表达产物 CryIac 蛋白对二点委夜蛾具有杀虫活性。尽管 Bt SC-40 菌株也含有 *cryIac* 基因, 可能是在该菌中 CryIac 蛋白表达量低于 HD-73 中 CryIac 蛋白表达量, 因而其毒力明显低于 Bt HD-73 菌株。

表 1 37 种菌株对二点委夜蛾 2 龄幼虫的杀虫活性 (100 mg/mL, 72 h)
Table1 The insecticidal activity of 37 Bt strains against 2nd larvae of *Athetis lepigone* (72 h, 100 mg/mL)

供试菌株	杀虫基因型 Gene types					校正死亡率 (%)
Strains	<i>cry1Ac</i>	<i>cry2Ac</i>	<i>cryII</i>	<i>vip3A</i>	其他 Others	Corrected mortality (%)
Bt L-2	*	*	*	*		100.0±0 a
Bt L-3		*	*	*	*	41.7±0.9 e
Bt L-5	*	*				75.0±5.0 b
Bt L-7	*	*	*	*	*	66.7±5.2 c
Bt L-10	*	*	*	*		100.0±0 a
Bt L-11		*	*		*	50.0±4.0 d
Bt L-12	*	*				79.2±8.0 b
Bt L-13	*	*	*	*		100.0±0 a
Bt L-17	*	*	*	*		100.0±0 a
Bt L-18	*	*		*	*	70.8±7.2 c
Bt L-19	*	*	*	*	*	75.0±9.6 b
Bt L-21		*		*	*	41.7±5.4 e
Bt L-22	*	*	*	*		100.0±0 a
Bt L-23	*	*	*		*	70.8±2.41 c
Bt L-25	*	*	*		*	58.3±5.4 d
Bt L-26	*	*	*	*	*	50.0±2.6 d
Bt SC-7		*	*			45.8±4.4 e
Bt SC-8	*	*	*	*	*	75.0±2.1 b
Bt SC-9	*	*	*		*	70.8±5.8 c
Bt SC-10	*	*		*	*	66.7±4.2 c
Bt SC-11	*	*	*		*	62.5±2.4 c
Bt SC-12	*	*		*	*	58.3±6.1 d
Bt SC-13			*			12.5±3.7 f
Bt SC-15		*			*	37.5 ±1.6 e
Bt SC-17	*	*			*	62.5 ±4.6 c
Bt SC-20	*	*		*	*	62.5 ±3.4 c
Bt SC-39	*	*	*	*		100.0±0 a
Bt SC-40	*	*	*	*		100.0±0 a
Bt SC-49	*		*	*	*	75.0 ±1.6b
Bt SC-50	*		*	*	*	70.8 ±4.8 c
Bt SC-51	*	*	*	*	*	70.8 ±6.1c
Bt SC-52	*	*	*	*	*	66.7±4.7 c
Bt SC-53		*	*	*		50.0±5.2 d
Bt YX-1	*	*	*	*	*	37.5±2.8 e
Bt HD-1	*	*	*	*	*	54.2±2.8 d
Bt HD-73	*					98.6±4.5 a
<i>Pseudomonas putida</i> PHB- <i>cry1Ab</i>					*(<i>cry1Ab</i>)	16.7±2.1 f

* 代表含有此基因。表中数据为平均值±SE, 表中不同小写字母表示处理与对照在 0.05 水平差异显著(Duncan's 多重比较法检验)。

* indicate gene in strain. The data in the table are mean±SE, and followed by the different letters in the same column indicate significant difference between treatment and control at 0.05 level by Duncan's multiple range test.

表 2 Bt SC-40 和 Bt HD-73 菌株对二点委夜蛾 2 龄幼虫的 LC_{50} (72 h)
Table 2 The LC_{50} of Bt SC-40 and Bt HD-73 against 2nd larvae of *Athetis lepigone* at 72 h

Bt 菌株 Bt strains	基因型 Gene types	LC_{50} ($\mu g/g$)	相关系数 Relation coefficient	95%置信区间 95% confidence intervals
Bt SC-40	<i>cry1Ac, cry2Ac, cryII, vip3A</i>	418.1	0.9836	383.7-449.7
Bt HD-73	<i>cry1Ac</i>	188.5	0.9369	84.73-261.9

2.3 Bt 菌株营养期杀虫蛋白对二点委夜蛾的杀虫活性

以含有 *vip3A* 基因的 Bt SC-40 菌株和 Bt HD-1 菌株为检测对象,以不含有 *vip3A* 基因的 Bt HD-73 菌株为阴性对照,测定了这 3 个 Bt 菌株培养 14 h 处于营养生长期的上清液的杀虫活性,结果表明(图 1),含有 *vip3A* 基因的 Bt SC-40 和 Bt HD-1 营养期上清液对二点委夜蛾 2 龄幼虫均具有一定的杀虫活性,72 h 校正死亡率分别达到 42.5%和 57.4%,而无 *vip3A* 基因的 Bt HD-73 营养期上清液未表现出杀虫活性。从这些结果初步推断营养期蛋白 Vip3A 对二点委夜蛾幼虫具有一定的杀虫活性。

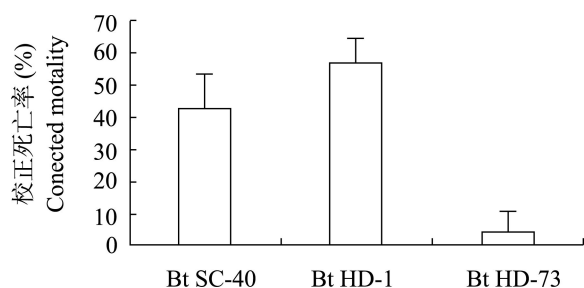


图 1 Bt 营养期上清液对二点委夜蛾 2 龄幼虫的杀虫活性 (72 h)

Fig. 1 Insecticidal activities of supernatants from Bt vegetable stage to 2nd larvae of *Athetis lepigone*

3 结论与讨论

本研究筛选得到了对二点委夜蛾幼虫具有较高毒力的 Bt 菌株 SC-40、Bt HD-73,也证实了对二点委夜蛾具有高毒力的 Bt δ -内毒素是 Cry1Ac 蛋白,同时营养期杀虫蛋白 Vip3A 对二点委夜蛾幼虫也有一定的杀虫活性。但是因为二

点委夜蛾具有在田间隐蔽为害和取食玉米根茎部位的特点(王振营等,2012),在生产上直接喷施 Bt 制剂不会有好的防效,所以这些菌株没有开发针对二点委夜蛾的 Bt 制剂的价值。目前针对鳞翅目害虫的转基因抗虫玉米中所应用的杀虫基因主要是 *cry1Ab* 基因(黎裕等,2000;吕霞等,2013),尽管该基因表达的产物对玉米螟、棉铃虫、甜菜夜蛾和粘虫等害虫有很好的防效(He *et al.*, 2003;王振营等,2005a, 2005b;常雪艳,2006;常雪等,2007),但是 *cry1Ab* 基因编码的 Cry1Ab 蛋白对二点委夜蛾却没有作用,因此,即使是推广现有的已商业化的转 Bt 基因玉米,也不能控制二点委夜蛾的为害,所以根据本实验的研究结果,将更多的 *cry* 基因转入玉米构建多价转基因抗虫玉米,在田间种植可以防治更多的玉米害虫。

参考文献 (References)

- Bravo A, Gill SS, Soberón M, 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4): 423-435.
- Bravo A, Likitvivatanavong S, Gill SS, Soberón M, 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 41(7): 423-431.
- Bravo A, Sarabia S, Lopez L, Ontiveros H, Abarca C, Ortiz A, Ortiz M, Lina L, Villalobos FJ, Peña G, Nuñez-Valdez ME, Soberón M, Quintero R, 1998. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(12): 4965-4972.
- He KL, Wang ZY, Zhou DR, Wen LP, Song YY, Yao ZY, 2003. Evaluation of transgenic Bt corn for resistance to the Asian corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.*, 96(3): 935-940.
- Hernández CS, Andrew R, Bel Y, Ferré J, 2005. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from potato-growing areas in

- Bolivia. *J. Invertebr. Pathol.*, 88(1): 8–16.
- Sanahuja G, Banakar R, Twyman RM, Capell T, Christou P, 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnol. J.*, 9(3): 283–300.
- 常雪, 常雪艳, 何康来, 王振营, 白树雄, 2007. 转 *cry1Ab* 基因玉米对粘虫的抗性评价. *植物保护学报*, 34(3): 225–228. [Chang X, Chang XY, He KL, Wang ZY, Bai SX, 2007. Resistance evaluation of transgenic Bt maize to Oriental armyworm. *Acta Phytophylacica Sinica*, 34(3): 225–228.]
- 常雪艳, 何康来, 王振营, 白树雄, 2006. 转 Bt 基因玉米对棉铃虫的抗性评价. *植物保护学报*, 33(4): 374–378. [Chang XY, He KL, Wang ZY, Bai SX, 2006. Evaluation of transgenic Bt maize for resistance to cotton bollworm. *Acta Phytophylacica Sinica*, 33(4): 374–378.]
- 何晓明, 束长龙, 刘晓垒, 李海涛, 高继国, 张杰, 宋福平, 2011. 苏云金芽胞杆菌新型 *vip3Aa* 基因的克隆、表达与活性分析. *农业生物技术学报*, 19(5): 932–937. [He XM, Shu CL, Liu XL, Li HT, Gao JG, Zhang J, Song FP, 2011. Cloning, expression and analysis of insecticidal activity of a novel *vip3Aa*-type gene from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 19(5): 932–937.]
- 黄大昉, 林敏, 2001. 农业微生物基因工程. 北京: 科学出版社. 1–546. [Huang DF, Lin M, 2001. Genetically engineered agricultural microorganisms. Beijing: Science Press. 1–546.]
- 姜京宇, 李秀芹, 许佑辉, 李智慧, 张志英, 许昊, 2008. 二点委夜蛾研究初报. *植物保护*, 34(3): 123–126. [Jiang JY, Li XQ, Xu YH, Li ZH, Zhang ZY, Xu H, 2008. Preliminary studies on *Athetis (Proxenus) lepigone*. *Plant Protection*, 34(3): 123–126.]
- 黎裕, 王天宇, 石云素, 2000. 转基因玉米的研究现状与未来. *玉米科学*, 8(4): 20–22. [Li Y, Wang TY, Shi YS, 2000. Current situation and future of trans-genic maize. *Journal of Maize Sciences*, 8(4): 20–22.]
- 吕霞, 王慧, 曾兴, 杨小艳, 翁建峰, 邱宏, 郭燕博, 王振华, 李新海, 2013. 转基因抗虫玉米研究及应用. *作物杂志*, (2): 7–12. [Lv X, Wang H, Zeng X, Yang XY, Weng JF, Di H, Guo YB, Wang ZH, Li XH, 2013. Research and Application of Transgenic Bt Corn for Insect Resistance. *Crops*, (2): 7–12.]
- 马继芳, 李立涛, 王新玉, 甘耀进, 董志平, 2012. 二点委夜蛾幼虫的形态特征、生活习性及其为害损失研究. *中国植保导刊*, 32(5): 16–19. [Ma JF, Li LT, Wang XY, Gan YJ, Dong ZP, 2012. Study on the damage, life habits and morphological characteristics of *Athetis lepigone*'s larva. *Chinese plant protection*, 32(5): 16–19.]
- 宋福平, 张杰, 谢天健, 杨自文, 戴莲韵, 李国勋, 1998. 苏云金芽胞杆菌 *cry* 基因 PCR-RFLP 鉴定体系的建立. *中国农业科学*, 31(3): 13–18. [Song FP, Zhang J, Xie TJ, Yang ZW, Dai LY, Li GX, 1998. The establishment of the *cry* gene from *Bacillus thuringiensis* PCR-RFLP identification system. *Agricultural Sciences of China*, 31(3): 13–18.]
- 王振营, 石洁, 董金皋, 2012. 2011 年黄淮海夏玉米区二点委夜蛾暴发危害的原因与防治对策. *玉米科学*, 20(1): 132–134. [Wang ZY, Shi J, Dong JG, 2012. Reason Analysis on Proxenus lepigone Outbreak of Summer Corn Region in the Yellow River, Huai and Hai Rivers Plain and the Countermeasures Suggested. *Journal of Maize Sciences*, 20(1): 132–134.]
- 王振营, 王冬妍, 何康来, 白树雄, 刘慧, 丛斌, 2005a. 转 Bt 基因玉米对甜菜夜蛾幼虫存活和发育的影响. *昆虫学报*, 48(2): 214–220. [Wang ZY, Wang DY, He KLL, Bai SX, Liu H, Cong B, 2005a. Effects of transgenic corn hybrids expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin on survival and growth of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner). *Acta Entomologica Sinica*, 48(2): 214–220.]
- 王振营, 王冬妍, 何康来, 白树雄, 丛斌, 2005b. 转 Bt 基因玉米对粘虫的室内杀虫效果评价. *植物保护学报*, 32(2): 153–157. [Wang ZY, Wang DY, He KL, Bai SX, Cong B, 2005b. Evaluation the control effects of the transgenic bacillus thuringiensis corn expressing Cry1Ab protein on the larvae of *mythimna separata* (Walker) in laboratory. *Acta Phytophylacica Sinica*, 32(2): 153–157.]